



Title	クロバネキノコバエ科の一種 <i>Sciara</i> sp. の越冬前蛹の生態と耐凍性
Author(s)	丹野, 皓三; TANN0, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 35, 63-74
Issue Date	1978-03-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17834
Type	departmental bulletin paper
File Information	35_p63-74.pdf



クロバネキノコバエ科の一種 *Sciara* sp. の越冬前蛹 の生態と耐凍性*

丹野 皓 三
(低温科学研究所)
(昭和52年9月受理)

I. 緒 言

越冬昆虫の中には自然条件下では起こりえない -196°C と云った温度での凍結に耐えて生存できるものも少なくない¹⁻³⁾。しかし耐凍性の非常に高い昆虫が越冬期に野外でかならずしも凍結するとは限らない。例えばイラガの越冬前蛹は -196°C の凍結にも耐えられるが、その過冷却点は -19.2°C であり⁴⁾、本州の平野部では虫体の凍結はまず起きないと思われる。越冬昆虫の生態を明らかにするには、その耐凍性及び過冷却点の測定と平行してその虫の越冬場所の微気象の観測が必要である。

本報は立枯れた植物の茎の中で越冬する昆虫の生態を明らかにする目的で行なった観察のひとつである。

II. 材料と方法

材料：1976年11月中旬及び翌年の4月中旬に野外から採集したクロバネキノコバエ科 (*Sciaridae*) の一種 *Sciara* sp. の前蛹を実験材料として用いた。この虫が越冬しているオオウバユリ *Lilium cordatum* var. *glehnii* Woodcock の茎を虫の入ったまま採集し、これを底に水を5 cm ほどの深さに入れたプラスチック容器に立て、湿度飽和にして 0°C で保存した。

越冬場所の温度測定：オオウバユリの茎の南側及び北側の内面で、地表から10 cmの高さに熱電対の先を固定し、1976年11月下旬から翌年の5月初旬まで茎の温度を自記記録計で測定した。また熱電対の先端を径3 cmのかさでおおい、太陽の直射光をさえぎり、地上1.5 mの気温を記録した。この方法で測定した気温は百葉箱で測定した気温よりも日中はかなり高くなった。

過冷却点の測定：前蛹を植氷により凍結した場合と自発凍結させた場合との二通りの過冷却点を求めた。植氷による凍結の方法をまず示す。ウバユリの茎片(1.5×1.5 cm)を水に浸し、前蛹をこれに脱脂綿ではりつけた。この前蛹に接する様に熱電対の先を固定した。これを内径3 cm 高さ8 cmのガラス管の中に宙ずりにし、さらに外側を径6 cm 高さ10 cmのプラスチック容器でおおい栓をした。この様にした前蛹を室温から -15°C の気相に入れて冷却すると先

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1880号

ズウバユリの茎が凍結し、その上にあるぬれた前蛹は氷に接して植氷され凍結を開始する。

温度変化を自記記録し、凍結曲線を得た。この凍結曲線から過冷却点を求めた。次に自発凍結の方法を示す。前記の二重管の中に濾紙で体表の水分を吸い取った前蛹を熱電対の先端に脱脂綿で固定して宙ずりにし、 -25°C の気相で冷却した。得られた凍結曲線から過冷却点を求めた。

耐凍性の観察： 前述の二重管に20個体の前蛹を入れて平均毎分 0.1°C の速度で冷却した。凍結の開始の方法は植氷と自発凍結の二通りを用いた。所定の温度に達してから24時間その温度におき、室温で融解した。融解後に前蛹を湿度飽和で 0°C の条件におき、30日後に正常に行動する個体を数えて生存率を求めた。

グリセリン及び糖含量の定量： 30頭又は11頭の前蛹をまとめてすりつぶし、80%エタノールで糖及びグリセリンを抽出した。グリセリンをアセチル化し⁵⁾、日立K53形ガスクロマトグラフ(Golay column SE-30 Silicon gumrubber)で分析した。糖類はアンスロン法⁶⁾により定量した。

凍結切片の作製： 前述の方法で毎分 0.1°C の冷却速度で凍結した前蛹を -15°C まで冷却し、この温度に24時間おいた。凍結した前蛹を -15°C の低温室内で木のブロックに接着剤で固定し、回転式マイクロームを用いて厚さ 10μ の凍結切片を得た。接着剤はアロンアルファ(東亜合成化学工業株式会社製)を -15°C に冷却して用いた。凍結切片は -15°C の低温室内でスライドガラスにのせ、シリコンオイルとカバーガラスをかけて検鏡した。

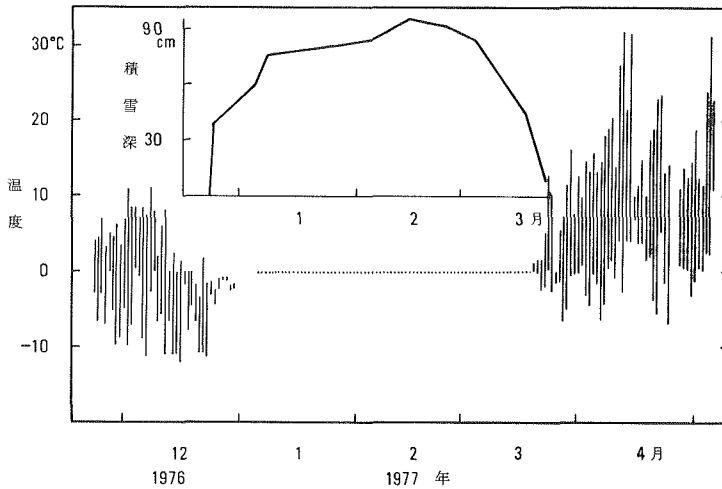
III. 結 果

越冬生態

1976年11月18日に立枯たオオウバユリの茎の内面に *Sciara* sp. の前蛹を見つけた。150から300頭の前蛹が径2cmほどの円板状の群体を作り、地表から約10cmの高さの茎の北側の内面に位置していた。茎の底には水が溜まっており、毛細管現象により茎の内面及び幼虫はぬれていた。この前蛹はぬれていれば蠕動により移動できるが、乾くとまったく移動できなかった。またこの前蛹は湿度飽和に保っておかないと、やがて乾燥により死亡した。同年12月14日午前10時の観察では、前蛹はすべて凍結して固化していた。前蛹のまわりの茎の内面は多数の氷晶でおおわれていた。この時の虫体の温度は -4°C であった。この時期の前蛹も10例のうち9例までが茎の北側の内面に群体を作っていた。1例は東西に分かれて群体を作り凍結していた。これらの前蛹を室温で融解すると、すべての個体は数分以内に活発に動きまわり、生存していた。

翌年の4月24日の観察では、気温の低い朝夕には地表より上の茎の部分が凍結して茎の内面に多数の氷晶がみとめられたが、前蛹は地表面下に降りて凍結していなかった。気温の上昇する昼間は太陽の輻射であたためられた茎の南側の内面に前蛹は集まっていた。気温が急に上昇した5月6日に前蛹は共同の繭を茎の中に作り始め、約10日後に羽化した。

前蛹が越冬しているオオウバユリの茎の温度を第1図に示した。茎の北側内面で地表から10cmのところの温度を記録した。この温度は秋及び冬期には前蛹がさらされる環境温度と一



第1図 オオウバユリの茎(地表から10 cmの内面)の日温度範囲と積雪深の季節変化

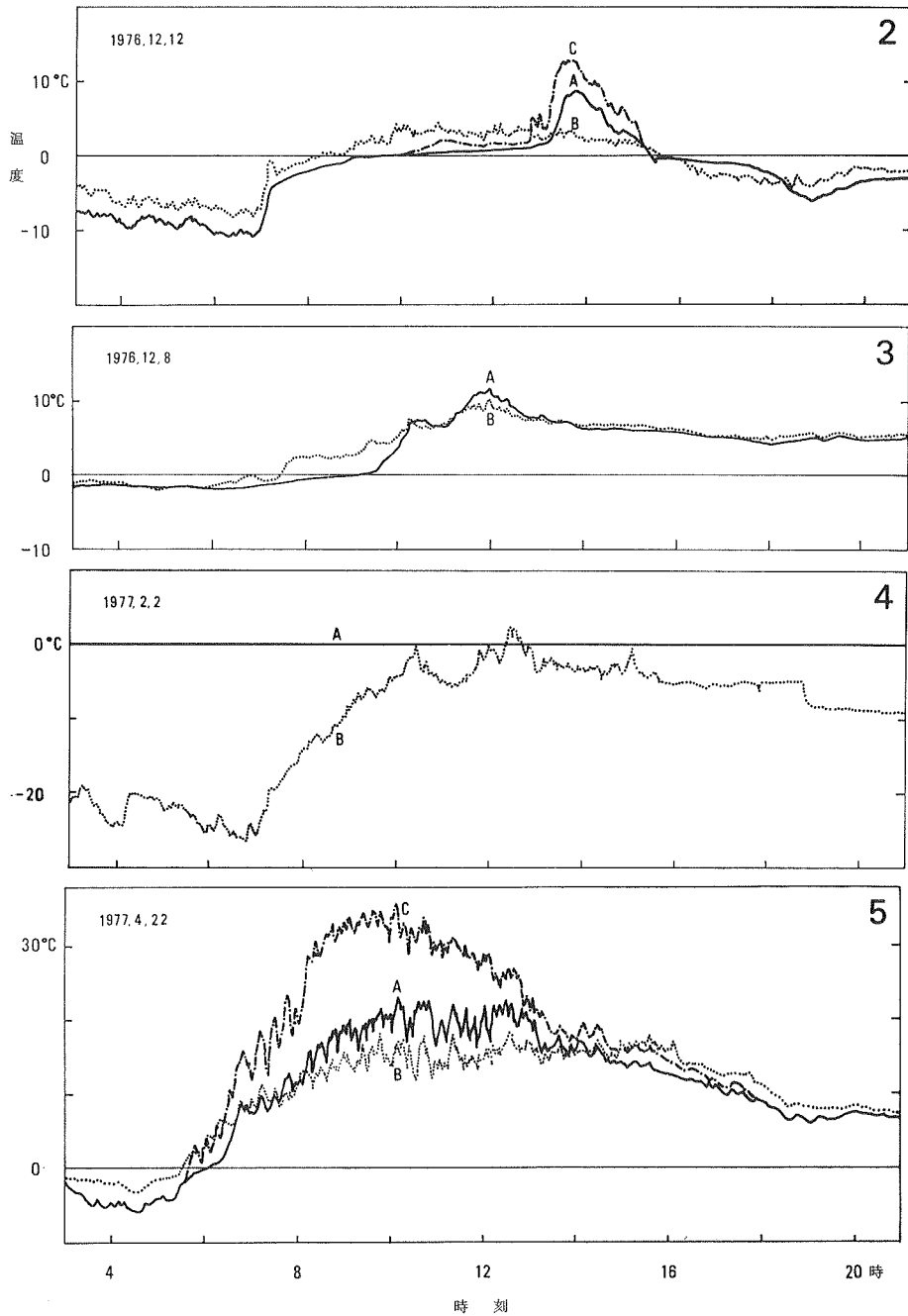
致するが、春期には前述のとおり前蛹が時刻により移動するので一致しない。

積雪深が50 cmを越す1月から3月中旬までは前蛹の越冬している茎の温度は 0°C であった。しかし秋及び春の積雪深が50 cm以下の場合にはしばしば茎の温度は 0°C 以下を記録した。茎の最低温度は1976年12月16日に -12°C を記録した。

野外で越冬しているこの前蛹は常に水で濡れているから、環境温度の降下により容易に植氷されると思われる。事実、第1表に示したとおり、この前蛹は $-4.2 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ で植氷され凍結する。この実験結果と第1図から、野外で越冬前蛹は積雪が少ない晩秋及び早春にしばしば凍結融解をくりかえしているものと考えられる。

次に環境温度の代表的な日変化をいくつか示す。オオウバユリの茎の温度は積雪がなく晴天の日には放射冷却により夜間は気温より数度低くなる(第2図)。日の出とともに気温が上昇し 0°C を越しても、茎の温度は氷の融解熱のために 0°C 近くの温度を数時間保っている。やがて融解した茎の温度は太陽の輻射熱により気温よりも高くなり、14時頃に最高温度に達する。茎の温度は直射日光を受ける南側の方が北側より数度高くなるが、日没後は南側と北側で差がなくなる。日没後茎は -1 から -1.5°C まで過冷却し凍結を開始する。茎の温度は水の凍結による凝固熱のため気温の降下よりも数時間おくらせて降下しはじめる。放射冷却のためやがて茎の温度は気温よりも低くなり、日の出直前に最低温度に達する。一方曇天の日には、朝夕の凍結及び融解の時期をのぞき気温と茎の温度はほぼ一致する(第3図)。積雪が50 cm以上あると茎の温度は気温が -20°C 以下でも 0°C であった(第4図)。従って前蛹は積雪のあるあいだ茎の中で未凍結状態で越冬している。

春になり積雪が融解すると、晴天の早朝にはしばしば茎の凍結がおきる(第5図)。しかしこの時期の蛹化の近づく前蛹は茎の中を移動して夜間は地表面下に降りて虫体の凍結を防ぐ行動を取る様になる。一方、日中は前蛹は直射日光であたためられた茎の南側内面に移動していた。

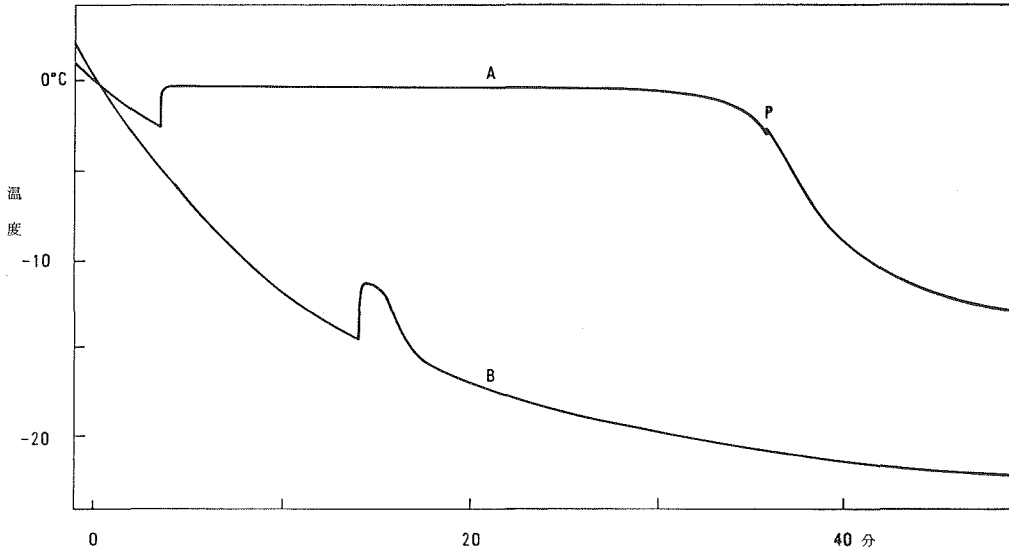


第2~5図 オオウバユリの茎(地表から10cmの内面)の日温度変化

2: 晴天, 積雪深0cm 3: 曇天, 積雪深0cm

4: 晴天, 雪積深84cm 5: 晴天, 積雪深0cm

A, 茎の北側; B, 気温; C, 茎の南側



第6図 *Sciara* sp. の越冬前蛹の凍結曲線

A: 植水による凍結 B: 自発凍結
 p: 前蛹の凍結による凝固熱

前蛹の過冷却点

野外観察の結果から、本実験に用いた *Sciara* sp. の前蛹は常に水に濡れた状態で越冬している事は明らかである。従ってこの前蛹は植水により凍結する機会が多いと考えられる。前蛹の過冷却点を植水した場合と、自然状態では起こらないと思われる自発凍結した場合について調べた。

得られた凍結曲線の一例を第6図に示した。植水による凍結の場合に、まず水で濡らした茎 (2×2 cm) が $-2.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ($n=10$) で凍結を開始する。茎に含まれる水の大部分が凍結し終ると茎の温度はふたたび降下を始め、まもなく茎に接触していた前蛹の凍結による凝固熱のため凍結曲線上に小さなピーク (P) が生ずる。この前蛹の過冷却点は $-4.2 \pm 1.4^\circ\text{C}$ ($n=8$) であった (第1表)。一方前蛹のまわりの水分を濾紙で吸い取り人工的に自発凍結をさせた場合は、前蛹の過冷却点は $-18.0 \pm 2.4^\circ\text{C}$ ($n=8$) であった (第1表)。

越冬前蛹の耐凍性

野外で越冬している *Sciara* sp. の前蛹はしばしば凍結融解をくりかえしているが、越冬後の前蛹はすべて生存しており、凍結による傷害はみとめられなかった。この前蛹が凍結状態でどのぐらいの低温に耐えられるかを、植水による凍結と自発凍結による場合とを比較して調べた (第2表)。11月29日の植水による凍結の実験結果は、越冬前蛹が -10°C までの凍結には十分に耐えてすべて生存

第1表 *Sciara* sp. 越冬幼虫の過冷却点
 1976. 11. 22~24

幼虫の過冷却温度 (°C)	
植水による凍結	自発凍結
-3.0	-15.5
-3.1	-15.9
-3.2	-16.0
-3.3	-17.0
-3.6	-17.3
-5.3	-20.0
-6.1	-20.3
-6.2	-22.0
平均値 4.2 ± 1.4	-18.0 ± 2.4

第2表 *Sciara* sp. 越冬幼虫の耐凍性

凍結温度 (°C)	日時	凍結融解後の生存率 (%)*			
		植氷による凍結		自発凍結	
		1976. 11. 29	1977. 4. 24	1976. 11. 29	1977. 4. 24
-5		100	100	**	**
-10		100	15	**	**
-15		65	0	0***	0****
-20		35	0	0	0
-25		0	0	0	0

* 各実験にそれぞれ 20 個体を用いた。それぞれの凍結温度に 24 時間おき、室温で融解してから湿度 100% で 0°C の条件におき、30 日後の生存率を調べた

** すべての個体は過冷却状態で生存していた

*** 3 個体は過冷却状態で生存していた

**** 4 個体は過冷却状態で生存していた

第3表 *Sciara* sp. 越冬幼虫に含まれる糖及びグリセリン

	使用個体数	糖含量 (mg/g)	グリセリン含量
1976. 11. 24	11	31.3	Trace
1977. 4. 24	30	17.1	Trace

している事を示している。-15°C の凍結にも半数以上の前蛹が融解後に生存しており、-20°C の凍結にも 35 パーセントの前蛹が生存していた。4 月 24 日に前蛹を植氷により凍結すると、-5°C の温度まで凍結させた場合にはすべての前蛹は融解後に生存していたが、-10°C では生存率は 15% に低下し、-15°C 以下の温度では凍結に耐えて生存するものはなかった。

一方、野外の自然条件下で起きないと考えられる自発凍結により前蛹を凍結すると、いかなる凍結温度でも、虫体の凍結が起きれば前蛹はすべて融解後に死亡していた。

越冬前蛹の糖及びグリセリン含量

多くの耐凍性昆虫と同様に、*Sciara* sp. の越冬前蛹にもグリセリンや糖類の存在が予想されるので調べた (第3表)。その結果この前蛹はグリセリンを含んでいなかったが、比較的多量の糖類を含んでいた。前蛹の糖含量は越冬期に多く (31.3 mg/g)、蛹化直前には少なくなっていた (17.1 mg/g)。

凍結切片による越冬前蛹の凍結状態の観察

越冬前蛹を -15°C の温度まで凍結させた場合に、植氷による凍結では半数以上の前蛹が融解後に生存しているが、人工的に自発凍結させた前蛹はすべて死亡した (第2表)。0°C から -15°C の温度までの前蛹の平均的冷却速度は、植氷及び自発凍結の場合とも 1 分間に 0.1°C であった。しかし自発凍結の場合には前蛹は植氷の場合よりもはるかに低い温度まで過冷却ししかもこの前蛹の体重は平均 10 mg ほどで非常に小さい。従って自発凍結が起きた直後に虫体内に単位時間あたりに析出する氷の量は植氷の場合よりもはるかに大きいと考えられる。この理由により、前蛹を凍結した場合に自発凍結させた方が植氷による凍結の場合よりも細胞内凍

結の機会が大きいと考えられる。

-15°Cで凍結した越冬前蛹から得た凍結切片を観察し、自発凍結と植氷による凍結との比較を行なった(図版 I-V)。結果は予想通り、植氷による凍結の場合には、細胞内にはもちろんの事、観察したすべての組織の内部にも氷晶はまったく認められず、組織は脱水されて収縮していた(脂肪体: 図版 I, IV-B, 絹糸腺: 図版 III-B, マルピギー氏管: 図版 III-F, 心臓: 図版 IV-D, 消化管噴門部: 図版 IV-F, 食道下神経節: 図版 V-B, 頭部筋肉: 図版 V-D, 背走筋: 図版 V-F)。

一方自発凍結の場合は、脂肪細胞(図版 II, IV-A)と消化管上皮細胞(図版 IV-E)及び食道下神経節の各細胞(図版 V-A)に例外なく細胞内氷晶が認められた。絹糸腺, マルピギー氏管, 心臓及び背走筋(図版 III-A, C, IV-C, V-E)は、植氷による凍結の場合と同様に、各組織内に氷晶は認められなかった。しかし同じ筋肉でも頭部の筋肉は自発凍結の場合に組織内に氷晶が認められた(図版 V-C)。

凍結切片を偏光顕微鏡で観察すると、虫体内の氷晶の結晶軸は植氷の場合よりも自発凍結の方が多方向を示している(図版 I, II)。この事実は自発凍結の場合に虫体内で活性化される結晶核の数が植氷による凍結の場合に比較して多い事を示している。消化管と連絡のある絹糸腺及び輸尿管, マルピギー氏管の内腔の氷晶の結晶軸はこれらの組織が接している体液中の氷晶の結晶軸とは異なり、むしろ距離的に遠い消化管内腔の氷晶の結晶軸と一致している(図版 I-B, II-B, 図版 III-C, D, E)。

IV. 考 察

積雪がその断熱効果により越冬期の昆虫をきびしい寒気から保護する事実は極地においても知られている⁷⁾。本実験に用いた *Sciara* sp. の越冬前蛹は -15°C の凍結には耐えられるが -20°C 以下の凍結には耐えられない。札幌では冬期に -20°C 以下に気温が低下することがある。しかしこの *Sciara* sp. の越冬前蛹は凍害を受けることなく越冬し、春には羽化することができる。これは最も低い気温にさらされる時期に 1 m 近い積雪におおわれるため、越冬場所の温度が 0°C 以下には降下しないためである。

積雪がほとんどない晩秋と早秋に、この前蛹が越冬しているオオウバユリの枯茎はしばしば凍結し、引き続き越冬前蛹の凍結がおきる。越冬期の昆虫を高い温度におくと、変態が進む前に耐凍性が低下する事実が多く昆虫で知られている⁸⁾。この *Sciara* sp. の越冬前蛹は、虫体の凍結にみまわれる晩秋には、直射日光を受けて温度の上昇する南側をさけて、オオウバユリの茎の北側に集まっている。この事実は耐凍性の保持にそった興味ある行動である。また 4 月下旬になり耐凍性の低下した前蛹が虫体の凍結をさけて夜間には茎の中を移動して地表下におり、日中は茎の南側に移動する事実も興味ある生態である。

Sciara sp. の前蛹は野外では常に湿ったオオウバユリの茎の内面で越冬している。この前蛹は腹脚がなく、湿っていないと移動できない。また人為的に前蛹のまわりの水分を取り去ると、前蛹は急速に水分を失って乾燥し死亡する。オオウバユリは自然状態では一般に湿潤な林床下に生育しており、オオウバユリの枯れた茎は毛細管現象で土中の水分を常にすい上げてい

る。その結果オオウバユリの茎の内部は *Sciara* sp. の前蛹に好ましい越冬環境を与えている。積雪も又、オオウバユリの茎の内部の湿度を保つのに役立っている。

野外で越冬している *Sciara* sp. の前蛹はこの様な湿った環境にいるために容易に植氷され凍結する。植氷により虫体の凍結を開始し、平均毎分 0.1°C の冷却速度で -15°C まで凍結した前蛹は、融解後に半数以上の個体が生存していた。一方同じ毎分 0.1°C の冷却速度で自発凍結により凍結した前蛹は、融解後に生存しているものはひとつもなかった。この違いは植氷による凍結では前蛹の各組織の細胞がすべて細胞外凍結であるのに対して、一方自発凍結においては生命の維持に直接重要な神経節の細胞等が細胞内凍結をおこしたためである。細胞内凍結が細胞にとって致命的な害である事実は多くの細胞ではほぼ例外なく知られている⁹⁾。平均の冷却速度が植氷による凍結の場合と同じでも、自発凍結の場合には過冷却が破れた直後の冷却速度は非常に大きい。そのために自発凍結の場合に細胞内凍結が起きるのであろう。

自発凍結の場合細胞内凍結は比較的細胞の大きい脂肪細胞や消化管上皮細胞等に認められたが、これ等の細胞よりはるかに小さい筋肉細胞等には認められなかった。この事実は他の生物細胞でも明らかにされており¹⁰⁾、大きい細胞ほど細胞体積に対する細胞表面積の割合が小さいため凍結過程で細胞からの脱水速度が小さくなり、細胞内凍結を起し易いと説明されている。

植氷により前蛹を凍結した場合に、 -15°C では前蛹の各組織内には氷晶が認められなかった。これと同じ組織外凍結とも云うべき凍結状態がポプラハバチの越冬前蛹でも観察されている³⁾。比較的過冷却点が高くしかも耐凍性を有する越冬昆虫の場合に、組織外凍結は野外の越冬期にしばしば起きる一般的現象である可能性が強い。各組織を包んでいる基底膜が体液からの植氷をはばみその結果組織外凍結をひきおこすのであろう。実際に絹糸腺及びマルピギー氏管の様に非常に長い管状の組織でも、その腔内の水はこれらの組織と接している体液から植氷される事はなく、はるかに遠い所で接続している消化管内の氷晶の成長により凍結している。

耐凍性のある越冬昆虫の体内にはグリセリン等の多価アルコールがほとんど例外なく含まれており、この多価アルコールが凍害防御物質として役立っていると考えられている^{2,11,12)}。ところがポプラハバチの越冬前蛹は -196°C の凍結に耐えられるが多価アルコールをまったく含んでおらず、そのかわり多量のトレハロースを主とする糖類を含んでいる³⁾。本実験に用いた *Sciara* sp. の越冬前蛹もポプラハバチと同様に耐凍性があるのに多価アルコールを含んでおらず、かわりに多量の糖類を含んでいた。高等植物の耐凍性と同様に¹³⁾、越冬昆虫の場合にもおそらく凍害防御物質として糖類が役立っているに違いない。

V. 摘 要

クロバネキノコバエ科の一種 *Sciara* sp. の越冬前蛹の生態並びに耐凍性を調べた。この前蛹は立枯たオオウバユリの茎の内面で、地表から約 10 cm のところに群体を形成して越冬していた。前蛹は晩秋には太陽の直射であたためられる茎の南側をさけて北側に分布していた。蛹化が近ずき耐凍性をほとんど失った 4 月下旬以降の前蛹は、夜間は茎の内面を伝わり地表面下におり、日中は太陽の直射であたためられた茎の南側に移動していた。

オオウバユリは湿った林床下に生育しているため、立枯た茎の内部は毛細管現象により常に水で濡れている。そのため前蛹は $-4.2 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ ($n=8$) で容易に植氷されて凍結した。越冬前蛹は積雪がほとんどない晩秋及び早春にしばしば凍結融解をくりかえしていた。野外で記録した前蛹の最低温度は -12°C であった。最低気温の現われる1月下旬には、積雪が90 cm 近くあり、前蛹の温度は 0°C で凍結していなかった。

越冬期の前蛹は植氷により凍結を開始し、毎分 0.1°C の冷却速度で冷却し -15°C に達してから24時間この温度に凍結状態におき室温で融解すると、半数以上の個体が生存していた。蛹化の近ずいた4月下旬の前蛹は -5°C までの凍結には耐えたが -10°C 以下の凍結にはほとんど耐えられなかった。

越冬前蛹の体内にグリセリンはほとんど含まれていなかったが、多量の糖類(31.3 mg/g)が含まれていた。耐凍性の低下する4月下旬には前蛹の糖含量は17.1 mg/gに低下した。

野外の自然状態では起きない事であるが、前蛹のまわりの水分を濾紙ですい取り前蛹を冷却すると、 $-18.0 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$ ($n=8$) まで過冷却するが、凍結が起きさえすれば前蛹は例外なく致命的傷害を受けて死亡した。一方植氷により -15°C まで凍結した前蛹は前述のとおり半数以上の個体が融解後生存していた。自発凍結と植氷による凍結の違いを明らかにする目的で、それぞれの凍結条件で凍結した前蛹から -15°C の温度で凍結切片を得て観察した。植氷により前蛹を凍結した場合に、体液が凍結してもすべての組織の内部に氷晶はまったく認められず、各組織は脱水されて収縮し変形していた。一方自発凍結の場合には、食道下神経節を構成する細胞と脂肪細胞及び消化管上皮細胞等の比較的大きい細胞は例外なく細胞内凍結を起こしていた。この事実から自発凍結による致命的傷害は細胞内凍結によることが明らかになった。

本研究を進めるにあたり、*Sciara* sp. の同定をして下さった京都府立大学笹川満広氏に感謝の意を表します。又積雪のデータを提供された本研究所遠藤八十一氏並びにグリセリンの定量を教示された竹原一郎氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Asahina, É. 1959 Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. *Nature*, **184**, 1003-1004.
- 2) Asahina, É. 1966 Freezing and frost resistance in insects. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 451-486.
- 3) Tanno, K. 1970 Frost injury and resistance in the poplar sawfly, *Trichiocampus populi* Okamoto. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 16**, 1-41.
- 4) 青木 廉・篠崎寿郎太郎 1953 イラガ前蛹の過冷却について. 低温科学, **10**, 101-108.
- 5) Laine, R. A., Esselman, W. J. and Sweeley, C. C. 1972 Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *In Method in Enzymology*, Academic Press, New York and London, **28**, 159-167.
- 6) Mokrasch, L. C. 1954 Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **208**, 55-59.
- 7) Downes, J. A. 1964 Arctic insects and their environment. *Can. Entomologist*, **96**, 279-307.
- 8) 朝比奈英三・竹原一郎 1964 イラガ前蛹の耐凍性補遺 I. 低温科学, 生物篇, **22**, 77-90.
- 9) 朝比奈英三 1971 細胞の凍結 低温生物学概説. 根井外喜男編, 東京大学出版会, 東京, 21-49.

- 10) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* **47**, 347-369.
- 11) Salt, R. W. 1961 Principles of cold-hardiness. *Ann. Rev. Entomology*, **6**, 55-74.
- 12) Sømme, L. 1964 Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. *Can. J. Zool.*, **42**, 87-101.
- 13) 酒井 昭 1960 木本類の耐凍性増大の過程 VII. 糖類の季節的変動 (2). 低温科学, 生物篇, **18**, 1-14.

Summary

The ecological observation on the overwintering prepupae of *Sciara* sp. (Sciaridae) was made in relation to their frost resistance.

Colonies of the prepupae were found in the dead stem of a herbaceous plant, *Lilium cordatum* var. *glehnii* Woodcock, throughout the cold season. The colonies were formed along the wet inside of the empty stem at a height of about 10 cm above the ground. The number of the prepupa in a colony was from about 150 to 300. The colonies always located in the north side in the stem in late autumn. On the other hand, the colony in late spring located in the south side during the day and moved to under ground part in the stem during the night.

The inside surface of the empty stem was always wet, because the plant grew on the wet ground under the trees. The wet prepupae, when they were cooled, easily froze at $-4.2 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ ($n=8$) by ice inoculation. Therefore, during late autumn and early spring the prepupae were observed to freeze several times. The minimum temperature of the frozen prepupae was -12°C . This was recorded before snow coming in late autumn. A thick snow cover of about 90 cm in depth was remaining on the ground throughout midwinter, and no prepupae within the stems under the snow cover were found to freeze.

When the overwintering prepupae were cooled down at the rate of $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ after an ice inoculation, more than half of them were able to survive after thawing from the body freezing at -15°C for 24 hours. In the end of April, however, only a few of the prepupae could survive freezing at -10°C for 24 hours.

In the overwintering prepupae a remarkably large amount of sugar, estimated to be 31.1 mg/g fresh body weight, was found, but the amount of glycerol was very slight. The amount of sugar in the prepupae decreased to 17.1 mg/g fresh body weight at the end of April.

When the overwintering prepupae were cooled at the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ without ice inoculation, they were supercooled to a temperature of $-18.0 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$ ($n=8$). While keeping at -15°C without ice inoculation, the 80 per cent of prepupae froze spontaneously within 24 hours. No prepupae frozen spontaneously could survive after thawing from the body freezing at -15°C .

The frozen sections from the prepupae frozen spontaneously and those frozen by an ice inoculation were observed at -15°C . No ice crystals were observed within the tissues of the prepupae frozen by ice inoculation. All the tissues were dehydrated and shrank between frozen haemolymph. On the other hand, when the prepupae froze spontaneously, intracellular freezing occurred in almost all the cells of ganglions, fat-bodys and epidermis of intestin. Therefore, it seems clear that the body freezing by ice inoculation was necessary for this overwintering prepupae in order to avoid injury caused by intracellular freezing.

図版説明

Sciara sp. の越冬前蛹を植氷により又は自発的に凍結させ、 -15°C に達してから 24 時間その温度においた後、 10μ の厚さの横断凍結切片を得た

図版 I 植氷による凍結、腹部第 5 節

- A:** 通常光による観察。すべての組織内に氷晶は認められない
d: 背走筋 f: 脂肪体 h: 心臓 m: 中腸 s: 絹糸腺 t: 背腹筋 v: 腹走筋
- B:** 偏光十字ニコルによる観察。脂肪体に含まれる脂肪球が低温度におかれたために球晶となり、強い光学的異方性を示している
中腸、絹糸腺及び心臓の各組織の内腔に氷晶が認められる。しかしこれらの各組織及び他のすべての組織の内部に氷晶は認められない。各組織は氷晶でみだされた体液の間で脱水され収縮している

図版 II 自発凍結、腹部第 5 節

- A:** 通常光による観察。脂肪体は細胞内凍結を起こしている
d: 背走筋 f: 脂肪体 h: 心臓 m: 中腸 s: 絹糸腺 t: 背腹筋 v: 腹走筋
- B:** 偏光十字ニコルによる観察

図版 III

- A:** 自発凍結。脂肪体 (f) 及び中腸上皮 (m) は細胞内凍結をしている。絹糸腺 (s) の内腔は氷晶で占められるがその組織には氷晶は認められない
- B:** 植氷による凍結。脂肪体 (f)、中腸上皮 (m) 及び絹糸腺 (s) は組織外凍結をしている
- C:** 自発凍結。脂肪体 (f) と後腸上皮 (h) は細胞内凍結をしている。マルピギー氏管 (m) と輸尿管 (u) の内腔は氷晶で占められるが、その組織内には氷晶は認められない。l は後腸内腔
- D:** C と同じものを偏光十字ニコルで観察した。後腸内腔、輸尿管及びマルピギー氏管内腔の氷晶は輝光位にある。脂肪体内の油滴とマルピギー氏管の細胞内顆粒が強い光学的異方性を示している
- E:** D と同じものを 90 度回転させて観察した。後腸内腔と輸尿管内腔の氷晶は消光位にある。マルピギー氏管内腔の氷晶も消光位にあるが、マルピギー氏管細胞内顆粒が強い光学的異方性を示すために明るく見える
- F:** 植氷による凍結。マルピギー氏管 (m) 及び脂肪体 (f) は組織外凍結をしている

図版 IV

- A:** 自発凍結。脂肪体は細胞内凍結をしている。白い円内に一ケの脂肪細胞が含まれる
- B:** 植氷による凍結。脂肪体の組織内には氷晶は認められない
- C:** 自発凍結。心臓 (h) 及びその弁 (v) の組織内に氷晶は認められない

- D:** 植氷による凍結。心臓 (h) の翼筋 (a) 及び脂肪体 (f) は組織外凍結をしている
- E:** 自発凍結。消化管噴門部の横断面。上皮細胞 (e) は細胞内凍結をしている
c: 固有膜, m: 中腸の内腔, p: 囲食膜, s: 噴門弁
- F:** 植氷による凍結。消化管噴門部の横断面。囲食膜, 上皮細胞及び固有膜は脱水されて収縮しひとつかたまりになって組織外凍結をしている (l)。 m: 中腸内腔, s: 噴門弁

図版 V

- A:** 食道下神経節の自発凍結。細胞内凍結をしている
- B:** 食道下神経節の植氷による凍結。組織外凍結をしている。そのために組織内は透明で、気管が観察される
- C:** 自発凍結。頭部の横断面。背幕状骨腕 (d) から伸びている筋肉 (m) の組織内に氷晶が多く認められる。しかし筋肉細胞は細胞外凍結である。v は頭頂
- D:** 植氷による凍結。頭部の横断面。背幕状骨腕 (d) から伸びている筋肉 (m) の組織は組織外凍結である。v は頭頂
- E:** 自発凍結。腹部第5節の横断面。脂肪体 (f) は細胞内凍結をしているが、背走筋 (i) は組織外凍結をしている。 c: 表皮, d: 背走気管, e: 上皮
- F:** 植氷による凍結。腹部第5節の横断面。脂肪体 (f) 及び背走筋 (i) は組織外凍結をしている。 c: 表皮, e: 上皮, l: 側走気管

